

*Ai miei genitori,  
" Love is caring enough not to hold on tightly "*

*Con affetto,  
Fabrizio*



UNIVERSITA' DI PISA  
Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

***DNA-FISH in cromosomi metafasici di Bos taurus su una  
sottosequenza della sequenza ripetuta S4  
(DDBJ: D16357)***

Candidato: Assenza Fabrizio      Relatori: Prof. Podestà Adriano

Prof. Montagnoli Giorgio

*ANNO ACCADEMICO 2006-2007*

## **Titolo**

DNA-FISH in cromosomi metafasici di *Bos taurus* su una sottosequenza della sequenza ripetuta S4 (DDBJ: D16357)

**Parole chiave:** *Bos taurus*. Cromosoma Y. Sorting del seme. DNA-F.I.S.H.. PNAs.

## **Abstract**

Questo esperimento dimostra la specificità della sonda fluorescente "Y-NOT" per il cromosoma Y di *Bos Taurus* tramite Fluorescent In Situ Hybridization (F.I.S.H.). Le preparazioni citogenetiche sono state ottenute secondo i protocolli standard, da linfociti di bovino maschio coltivati a partire da sangue intero. La sonda è stata progettata sulla regione compresa tra la base 141 e 191 della sequenza ripetuta S4 (1542 bp, XXX), dove si trovano 50 ripetizioni consecutive della coppia gt. La sequenza nucleotidica di "Y-NOT" è 5'-cacacacacacacacacacaca-3' e la sua estremità 5' è marcata con FITC. Le dimensioni della sonda sono state ideate utilizzando l'implementazione dell'algoritmo B.L.A.S.T. estendendo la ricerca della sottosequenza rappresentata da "Y-NOT" sul genoma di *Bos taurus*.. La sonda è stata ottenuta in single-strand e liofilizzata da fonte commerciale. Il segnale di ibridazione si localizza unicamente sul cromosoma Y, dimostrando che le dimensioni della sonda sono idonee a ottenere un segnale analitico intenso, mantenendo la specificità di marcatura della sequenza 5'-gtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt-3' per il cromosoma Y bovino. Il risultato sperimentale ha dato il via allo sviluppo di un approccio originale al sex sorting del seme bovino, basato sull'utilizzo di acidi nucleici peptidici (PNA).

## **Title**

DNA-F.I.S.H. on chromosome spreads of *Bos taurus* to a subsequence of the repeated sequence S4 (DDBJ: D16357)

**Keywords:** *Bos taurus*. Y-Chromosome. Sperm sorting. DNA-F.I.S.H.. PNAs

## **Abstract**

The Fluorescent In Situ Hybridization (F.I.S.H.) experiment demonstrates the specificity of the fluorescent probe "Y-NOT" for the Y-chromosome of *Bos taurus* . The bovine chromosome spreads were obtained by standard cytogenetic protocols, on lymphocytes cultivated from male bovine whole blood. The probe was designed on the region between the base 141 and 191 of the repeated sequence S4 (1542 bp, XXX), where there are 50 consecutive repetition of the couple gt. nucleotide sequence of "Y-NOT" is 5'-cacacacacacacacacacaca-3' and its 5' end is labeled with FITC The probe length was deduced by implementing the algorithm B.L.A.S.T. Extending the search for the "Y-NOT" subsequence to the whole *Bos taurus* genome. The probe was obtained as a single strand polymer and lyophilized from a commercial source. The hybridization signal was localized exclusively to the Y-chromosome. The result demonstrates that the probe size allows an intense analytical signal to be obtained while preserving the specificity of the 5'-gtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt-3' sequence for the bovine Y-chromosome. The experimental result open the way to an original approach to sex sorting of bovine semen, based on peptide nucleic acids (PNAs).

# **SOMMARIO**

## **I. Introduzione**

- i. Stato dell'arte
  - a) distribuzione centrifuga controcorrente CCCC*
  - b) approccio immunologico*
  - c) citofluorimetria a flusso*
  - d) bibliografia*
- ii. Contesto economico
  - a) il mercato riproduttivo bovino*
  - b) il ruolo del seme sessato nei sistemi riproduttivi contemporanei*
  - c) sistemi riproduttivi sperimentali a ridotto fabbisogno di seme sessato*
  - d) bibliografia*

## **II. Parte sperimentale**

- i. Tecnologia utilizzata
  - a) B.L.A.S.T. (Basic Local Alignment Search Tool)*
  - b) F.I.S.H. (fluorescence in situ hybridization)*
  - c) microscopia a fluorescenza*
  - d) F.I.S.H. su cromosomi*
  - e) bibliografia*
- ii. Esperimento
  - a) materiali e metodi*
  - b) risultati*

## **III. Discussione**

**- Ringraziamenti -**